



中华人民共和国国家标准

GB/T 20466—2006

水中微囊藻毒素的测定

Determination of microcystins in water

2006-08-24 发布

2007-01-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准由中国科学院提出。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国科学院水生生物研究所。

本标准主要起草人：甘南琴、肖邦定、宋立荣、刘永定、陈伟。

水中微囊藻毒素的测定

1 范围

本标准规定了高效液相色谱法和间接竞争酶联免疫吸附法测定水中微囊藻毒素(环状七肽)的条件和详细分析步骤。

本标准适用于饮用水、湖泊水、河水、地表水中微囊藻毒素的测定。

样品中微囊藻毒素的检出限:高效液相色谱法和酶联免疫吸附法均为 0.1 μg/L。

2 微囊藻毒素的分子式、分子质量及结构式

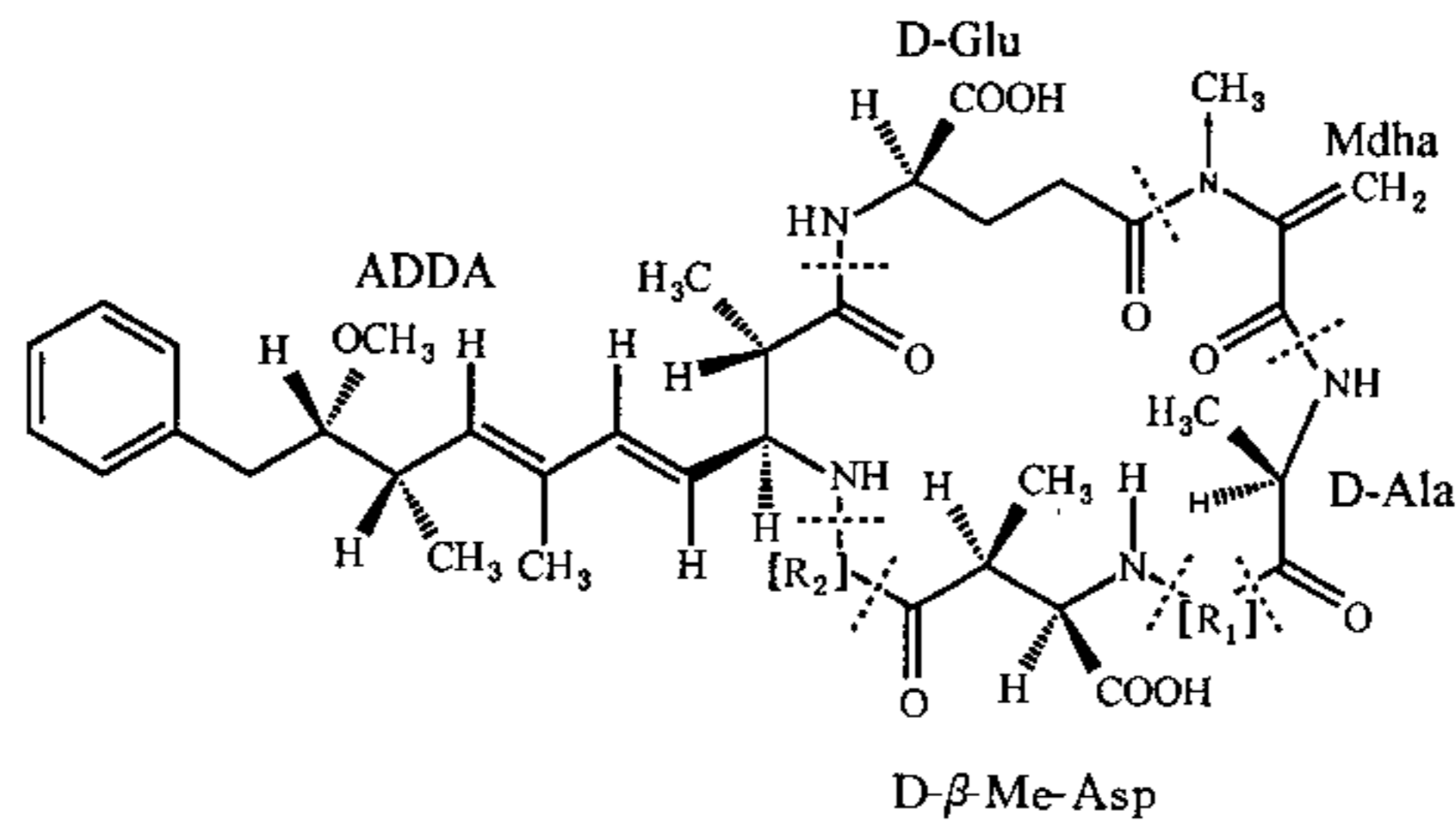
2.1 分子式

微囊藻毒素-RR(MC-RR): $C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$, 微囊藻毒素-YR(MC-YR): $C_{52}H_{72}N_{10}O_{13}$, 微囊藻毒素-LR(MC-LR): $C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$ 。

2.2 分子质量

MC-RR: 1 038.2, MC-YR: 1 044.0, MC-LR: 994.5。

2.3 结构式



MC-RR、MC-YR、MC-LR 中的 R_1 和 R_2 见表 1。

表 1 MC-RR、MC-YR、MC-LR 中的 R_1 和 R_2

微囊藻毒素名称	R_1	R_2
MC-RR	L-Arg	L-Arg
MC-YR	L-Tyr	L-Arg
MC-LR	L-Leu	L-Arg

3 高效液相色谱法

3.1 方法提要

微囊藻毒素在波长 238 nm 下有特异的吸收峰。不同的微囊藻毒素异构体在高效液相色谱中有不同的保留时间,与标准微囊藻毒素的保留时间相比较,可确定样品中微囊藻毒素的组成。依据出峰面积,计算水样中微囊藻毒素的含量。

3.2 试剂和溶液

除非另有规定,仅使用分析纯试剂、蒸馏水或去离子水。

- 3.2.1 甲醇:色谱纯。
- 3.2.2 20%(体积分数)甲醇溶液:20 mL 甲醇(3.2.1)与 80 mL 水混合。
- 3.2.3 50%(体积分数)甲醇溶液:50 mL 甲醇(3.2.1)与 50 mL 水混合。
- 3.2.4 磷酸二氢钾溶液(0.05 mol/L):称取 0.68 g 磷酸二氢钾,用水溶解,定容至 100 mL。
- 3.2.5 20%(体积分数)磷酸溶液:20 mL 磷酸与 80 mL 水混合。
- 3.2.6 三氟乙酸(TFA):色谱纯。
- 3.2.7 磷酸盐缓冲溶液:用 20%(体积分数)磷酸溶液(3.2.5)将磷酸二氢钾溶液(3.2.4)调至 pH 3.0。
- 3.2.8 淋洗溶液:10 mL 水;10 mL 20%(体积分数)甲醇溶液(3.2.2)。
- 3.2.9 洗脱溶液(酸化甲醇溶液):用甲醇(3.2.1)将 0.1 mL 三氟乙酸(3.2.6)定容至 100 mL。
- 3.2.10 微囊藻毒素标准品:微囊藻毒素-LR (MC-LR)、微囊藻毒素-RR (MC-RR)、微囊藻毒素-YR (MC-YR),纯度不低于 95%。
- 3.2.11 微囊藻毒素标准储备液:分别称取微囊藻毒素标准品(3.2.10)MC-LR、MC-RR、MC-YR 各 0.5 mg(按实际含量折算),用 500 μ L 甲醇(3.2.1)溶解,再用纯水定容至 50 mL, -20 $^{\circ}$ C 保存。此标准储备溶液的浓度约为 10 μ g/mL。
- 3.2.12 标准系列溶液:用 20%(体积分数)甲醇(3.2.2)将微囊藻毒素标准储备溶液(3.2.11)分别稀释至约 0.00 μ g/mL、0.1 μ g/mL、0.2 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、2 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL(临用时配制)。

3.3 仪器和设备

- 3.3.1 不锈钢筛:500 目。
- 3.3.2 不锈钢或玻璃杯式滤器:250 mL。
- 3.3.3 抽滤瓶:带真空泵。
- 3.3.4 滤膜:GF/C 玻璃纤维滤膜和 0.45 μ m 乙酸纤维素滤膜。
- 3.3.5 C₁₈固相萃取小柱: Sep-pak 柱, 500 mg/6 mL。
- 3.3.6 50 mL 玻璃注射器、100 mL 玻璃注射器或 SPE 固相萃取装置。
- 3.3.7 旋转蒸发器或吹氮浓缩器。
- 3.3.8 涡旋混合器。
- 3.3.9 高效液相色谱仪:配有紫外可见光检测器。
- 3.3.10 色谱柱:C₁₈反相柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,填料粒径 5 μ m。

3.4 分析步骤

3.4.1 水样的采集和保存

用采水器采集 1 500 mL~2 000 mL 水样(水样采集后,应在 4 h 内完成以下前处理步骤)。用 500 目的不锈钢筛(3.3.1)过滤,除去水样中大部分浮游生物和悬浮物。取过滤后的水样 1 200 mL 于玻璃杯式滤器(3.3.2)中,依次经滤膜(3.3.4)减压过滤。准确量取 1 000 mL 滤液置于棕色试剂瓶中。

注:如减压过滤后的水样不能立即分析,可置于玻璃容器中,在 -20 $^{\circ}$ C 保存,30 d 内分析完毕。

3.4.2 水样的富集和洗脱

3.4.2.1 C₁₈固相萃取小柱(3.3.5)预活化

用玻璃注射器吸取 10 mL 甲醇(3.2.1),注入 C₁₈固相萃取小柱(自然滴下)。当甲醇液面接近小柱上层筛片时,加入 10 mL~15 mL 纯水活化(活化过程,不应使 C₁₈固相萃取小柱变干,萃取小柱中应始终充满液体)。连接 50 mL 或 100 mL 玻璃注射器,或连接 SPE 固相萃取装置(3.3.6)。

3.4.2.2 微囊藻毒素的富集和洗脱

将 1 000 mL 水样滤液(3.4.1)依次注入 50 mL 玻璃注射器、100 mL 玻璃注射器或 SPE 固相萃取装置(3.3.6)中,使水样滤液流经预先活化的 C₁₈固相萃取小柱(3.4.2.1)进行富集(控制流速为 8 mL/min~10 mL/min)。富集完毕,依次用淋洗溶液(3.2.8)淋洗 C₁₈固相萃取小柱。再用 10 mL 洗

脱溶液(3.2.9)洗脱微囊藻毒素(萃取过程,不应使 C_{18} 固相萃取小柱变干,萃取小柱中应始终充满液体)。洗脱液收集在玻璃容器中。保留富集后的水样,用于再次富集。

3.4.2.3 再次富集和洗脱

按 3.4.2.2 的操作步骤,再次富集、洗脱。

注:有条件的实验室可选择较大柱容量的 C_{18} 固相萃取小柱,只需对水样富集、洗脱一次。

3.4.3 定容

将两次洗脱液混合,在 40°C 下用旋转蒸发器或吹氮浓缩器(3.3.7)浓缩至干。用 1 mL 甲醇(3.2.1)分两次(第一次、第二次各 0.5 mL)溶解浓缩至干的物质,用涡旋混合器(3.3.8)充分涡旋混合 1 min。用尖嘴吸管取出,小股氮气流吹干(或离心干燥),加 50%(体积分数)甲醇溶液(3.2.3)定容至 100 μL 。此步骤均应在玻璃容器中操作。

3.4.4 测定

3.4.4.1 色谱条件

- 色谱柱温度: 40°C ;
- 流动相:甲醇(3.2.1)与磷酸盐缓冲溶液(3.2.7)按体积比(57:43)混合;
- 流速:1 mL/min;
- 检测器:紫外可见光检测器波长 238 nm。

3.4.4.2 定量

用进样器分别吸取 10 μL 标准系列溶液(3.2.12),注入高效液相色谱仪(3.3.9)。在上述色谱条件(3.4.4.1)下测定标准系列溶液的响应峰面积。以响应峰面积为纵坐标,标准系列溶液的浓度为横坐标,绘制标准曲线或计算回归方程。

吸取 10 μL 试样(3.4.3)注入液相色谱仪,在上述色谱条件(3.4.4.1)下测定试样的响应峰面积(应在仪器检测的线性范围内)。依据测定的响应峰面积,在标准曲线上查出(或用回归方程计算出)水样中微囊藻毒素的含量。

在上述色谱条件(3.4.4.1)下,MC-RR、MC-YR、MC-LR 的保留时间分别约为 8.8 min、9.5 min、10.6 min。

在上述色谱条件(3.4.4.1)下,标样及水样中微囊藻毒素的色谱图见图 1 和图 2。

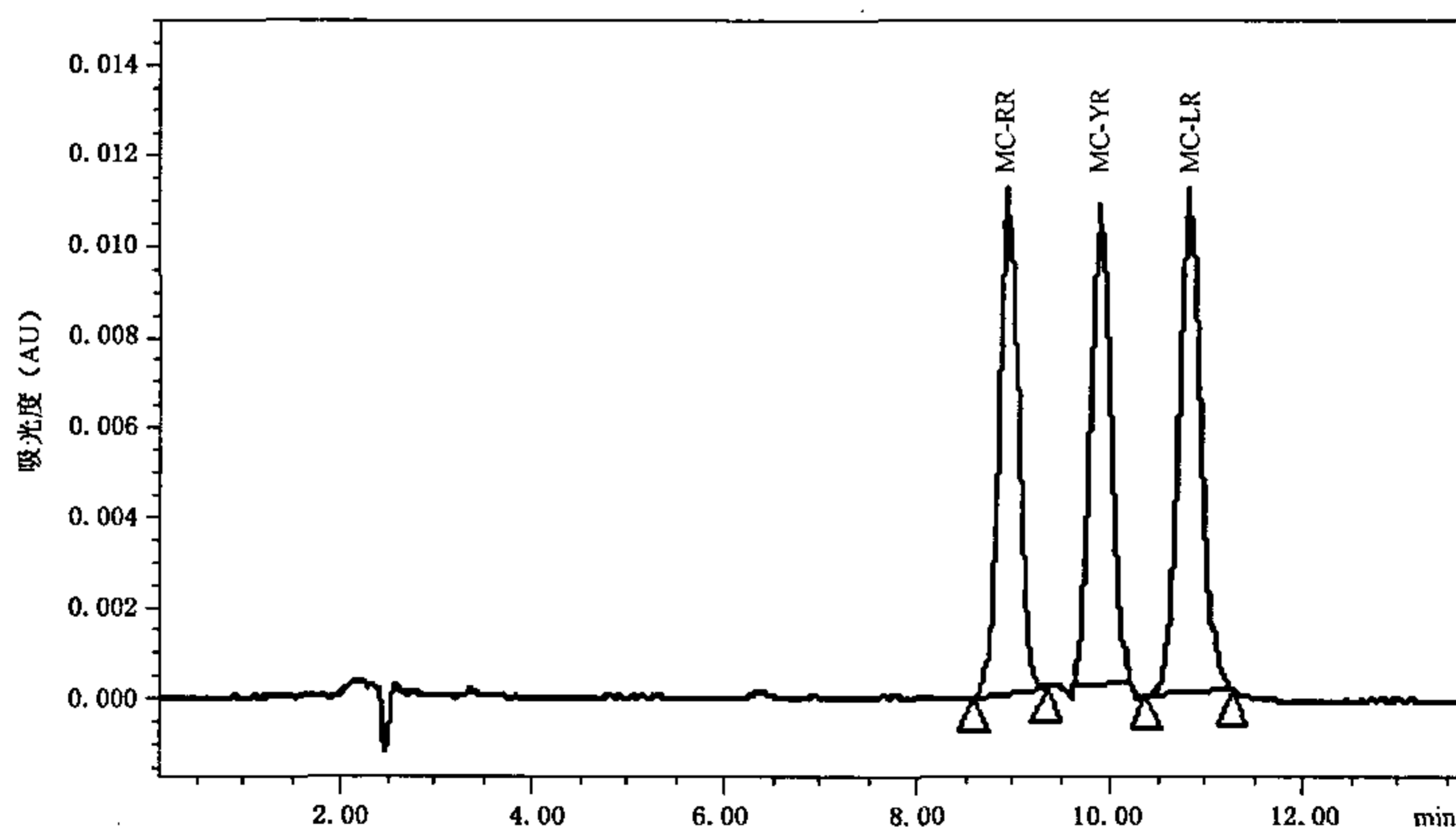


图 1 微囊藻毒素(MC-RR、MC-YR、MC-LR)标样色谱图

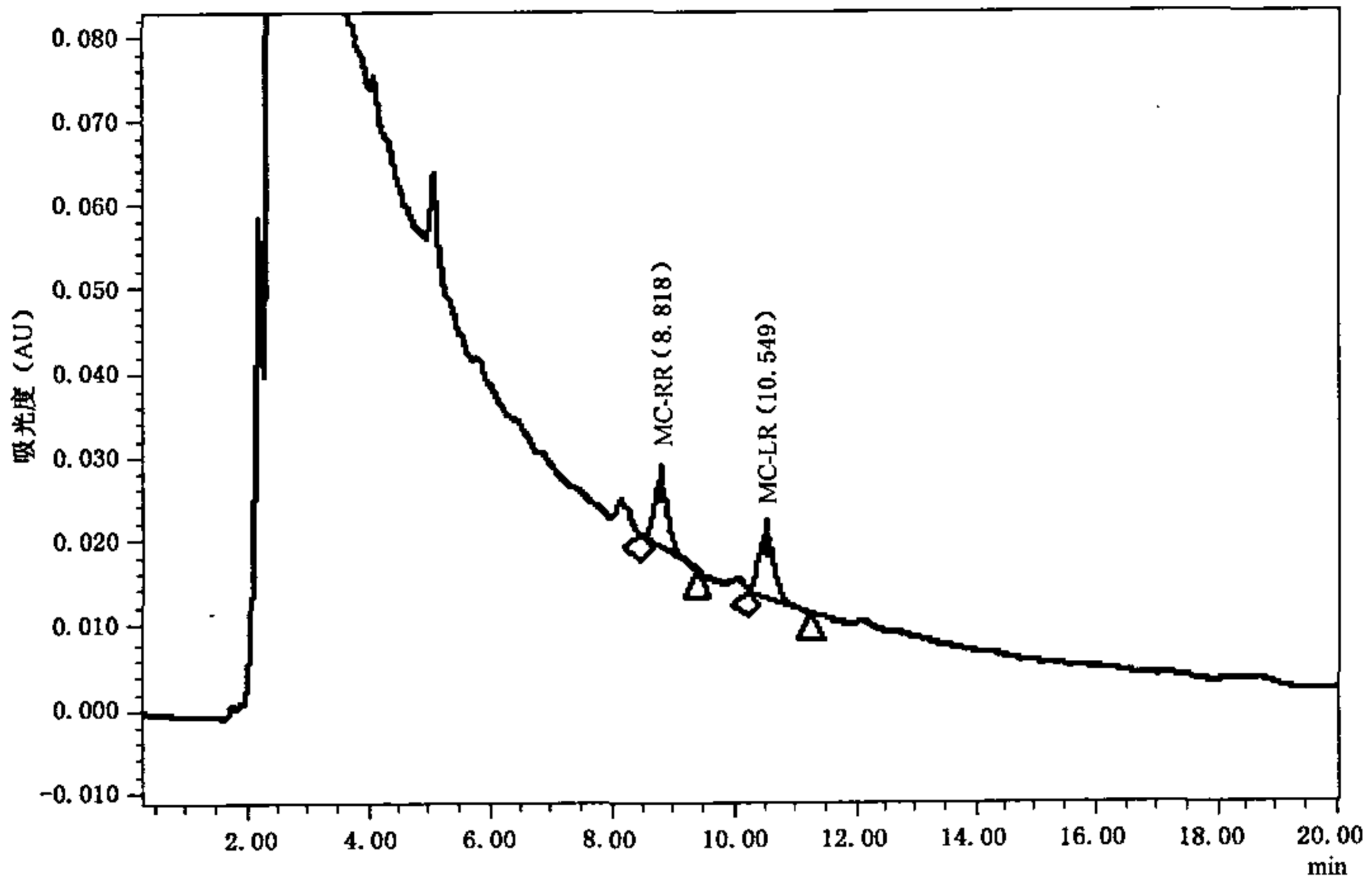


图 2 水样微囊藻毒素色谱图

3.5 结果计算

水样中微囊藻毒素的含量(X_1)以 $\mu\text{g/L}$ 表示,按式(1)计算:

$$X_1 = \frac{c_1 \times V_1}{V} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X_1 ——分别代表 MC-RR、MC-YR、MC-LR 的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

c_1 ——从标准曲线上查出的微囊藻毒素(MC-RR、MC-YR、MC-LR)的含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_1 ——水样定容体积数,单位为毫升(mL);

V ——采集水样的体积数值,单位为毫升(mL)。

计算结果应表示到小数点后两位。

3.6 允许差

同一水样,两次平行测定结果之差,不得超过平均值的 10%。

4 间接竞争酶联免疫吸附法

4.1 方法提要

水中的微囊藻毒素经离心或过滤处理后与一定量的特异性抗体反应,多余的游离抗体则与酶标板内的包被抗原结合。加入酶标记物和底物显色,与标准微囊藻毒素比较,计算水样中微囊藻毒素的含量。

4.2 试剂

除非另有规定,仅使用分析纯试剂、蒸馏水或去离子水。

4.2.1 抗微囊藻毒素(MC-LR)的单克隆抗体:杂交瘤技术制备,经亲和层析纯化。

4.2.2 人工抗原:MC-LR-牛血清白蛋白结合物(MC-LR-BSA)。

4.2.3 20%(体积分数)乙醇溶液:20 mL 乙醇与 80 mL 水混合。

4.2.4 标准稀释液:称取 0.005 g 明胶和 0.1 g 叠氮化钠,用水溶解,定容至 100 mL。

4.2.5 微囊藻毒素(MC-LR)标准系列溶液:称取适量微囊藻毒素(MC-LR)标准品(3.2.10),用 20%(体积分数)乙醇溶液(4.2.3)配制成 MC-LR 含量为 0.5 mg/mL 的溶液。再用标准稀释液(4.2.4)稀

释至 MC-LR 含量为 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。继续配制 MC-LR 含量分别为 $0.1\ \mu\text{g}/\text{L}$ 、 $0.2\ \mu\text{g}/\text{L}$ 、 $0.5\ \mu\text{g}/\text{L}$ 、 $1\ \mu\text{g}/\text{L}$ 、 $2\ \mu\text{g}/\text{L}$ 的标准系列溶液。

4.2.6 牛血清白蛋白(BSA):生化试剂。

4.2.7 酶标二抗:辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠 IgG。

4.2.8 磷酸盐缓冲溶液(pH7.4):分别称取 0.2 g 磷酸氢二钾、2.9 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、8.0 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾,混合,用水溶解,定容至 1 000 mL。

4.2.9 乙酸钠溶液(0.1 mol/L):称取 1.36 g 三水合乙酸钠,用水溶解,定容至 100 mL。

4.2.10 乙酸溶液(1 mol/L):量取 5.88 mL 冰乙酸,加水定容至 100 mL。

4.2.11 硫酸溶液(1 mol/L):量取 55.6 mL 浓硫酸,沿玻棒缓缓注入约 200 mL 水中,搅拌,冷却至室温,加水定容至 1 000 mL。

4.2.12 包被溶液:称取 1 mg 人工抗原(4.2.2),溶解于 1 000 mL 磷酸盐缓冲溶液(4.2.8)中。

4.2.13 封闭溶液:称取 0.5 g 明胶,加少量磷酸盐缓冲溶液(4.2.8),加热溶解,冷却后定容至 1 000 mL。

4.2.14 洗涤溶液(PBS-T):量取 0.5 mL 吐温-20,用磷酸盐缓冲溶液(4.2.8)定容至 1 000 mL。

4.2.15 抗体稀释溶液:称取 0.5 g 明胶,加少量洗涤溶液(4.2.14),加热溶解,冷却后定容至 1 000 mL。

4.2.16 二抗溶液:1 体积抗体稀释溶液(4.2.15)与 5 000 体积酶标二抗(4.2.7)混合。

4.2.17 底物缓冲溶液:用乙酸溶液(4.2.10)调整乙酸钠溶液(4.2.9)的 pH 为 5.0。

4.2.18 底物储备溶液:称取 10 mg 四甲基联苯胺(TMB),溶于 1 mL 二甲基亚砜(DMSO)中。

4.2.19 底物溶液:量取 100 μL 底物储备溶液(4.2.18),加 2 μL 30% 过氧化氢和 10 mL 底物缓冲溶液(4.2.17)。临用时配制。

4.3 仪器

4.3.1 不锈钢筛:500 目。

4.3.2 高速离心机。

4.3.3 电动振荡器。

4.3.4 酶标仪:内置 450 nm 滤光片。

4.3.5 培养箱:可控温度,37℃。

4.3.6 酶标微孔板:96 孔。

4.3.7 微量加样器及配套吸头。

4.4 分析步骤

4.4.1 水样的采集和保存

可按 4.4.1.1 或 4.4.1.2 操作。

4.4.1.1 采集约 5 mL 水样,用 500 目的不锈钢筛(3.3.1)过滤于玻璃杯式滤器(3.3.2)中(除去水样中大部分浮游生物和悬浮物),再经滤膜(3.3.4)减压过滤,保留滤液。

4.4.1.2 采集约 5 mL 水样,用 500 目的不锈钢筛(3.3.1)过滤(除去水样中大部分浮游生物和悬浮物),取 1 mL 滤液置于离心管中,用高速离心机离心(9 000 r/min)3 min,取上清液保留。

注:如减压过滤或离心后的水样不能立即分析,可置于玻璃容器中,在 -20℃ 保存,30 d 内分析完毕。

4.4.2 测定

4.4.2.1 包被酶标微孔板

将包被溶液(4.2.12)加入酶标微孔板(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$),4℃ 下放置过夜。

4.4.2.2 封闭酶标微孔板

用洗涤液(4.2.14)洗涤 3 次放置过夜的酶标微孔板(每次洗涤 3 min),加入封闭溶液(4.2.13)封闭酶标微孔板(200 $\mu\text{L}/\text{孔}$),37℃ 下放置 2 h,或 4℃ 下放置过夜。

4.4.2.3 抗原抗体反应

以下操作同时进行。

a) 量取 500 μL 抗微囊藻毒素(MC-LR)的单克隆抗体(4.2.1)和 500 μL 微囊藻毒素标准系列溶液(4.2.5 中的 $0.1\ \mu\text{g}/\text{L}$ 溶液)于 1.5 mL 试管中,混合后用电动振荡器(4.3.3)振荡,室温静

置 30 min。

按以上操作配制其余反应液。这些反应液用于制作微囊藻毒素标准抑制曲线。

- b) 量取 500 μL 抗微囊藻毒素(MC-LR)的单克隆抗体(4.2.1)和 500 μL 水样(4.4.1)于 1.5 mL 试管中,混合后用电动振荡器(4.3.3)振荡,室温静置 30 min。此反应液用于测定水样中微囊藻毒素的含量。

4.4.2.4 竞争反应

用洗涤液(4.2.14)洗涤 3 次封闭过的酶标微孔板(每次洗涤 3 min),滴加抗原抗体反应溶液(4.4.2.3)(100 μL/孔)。不同浓度做两次平行试验。37℃或室温放置 90 min。在酶标微孔板的适当孔位滴加抗体稀释溶液(4.2.15),作为阴性对照。

4.4.2.5 二抗溶液与抗微囊藻毒素(MC-LR)的单克隆抗体反应

用洗涤液(4.2.14)洗涤 3 次竞争反应后的酶标微孔板(每次洗涤 3 min),滴加二抗溶液(4.2.16)(100 μL/孔),37℃或室温放置 30 min。

4.4.2.6 显色及显色后吸光度的确定

用洗涤液(4.2.14)洗涤 5 次经 4.4.2.5 反应的酶标微孔板(每次洗涤 3 min)。滴加底物溶液(4.2.19)(100 μL/孔),37℃或室温放置 15 min~20 min,显色。滴加 1 mol/L 硫酸(4.2.11)(50 μL/孔),终止显色反应。

30 min 内,用酶标仪(4.3.4)在 450 nm 处,测定显色后的吸光度。

4.4.2.7 定量

取经 4.4.2.6 测定的标准系列溶液的吸光度平均值与水样吸光度平均值,按式(2)分别计算标准系列溶液吸光度(或水样吸光度)与阴性对照试验的比值(X₂),其数值以%表示。

$$X_2 = \frac{OD_1}{OD_2} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X₂——标准系列溶液吸光度(或水样吸光度)与阴性对照试验的比值,%;

OD₁——标准系列溶液的吸光度平均值与水样吸光度平均值;

OD₂——水样吸光度平均值。

以 X₂ 为纵坐标,不同标准系列溶液浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线或计算回归方程。依据测定水样的吸光度,在标准曲线上查出(或用回归方程计算出)样品中微囊藻毒素的含量。

4.5 结果计算

水样中微囊藻毒素的含量(X₃)以 μg/L 表示,按式(3)计算:

$$X_3 = c_2 \times V_2 \dots\dots\dots(3)$$

式中:

X₃——水样中微囊藻毒素的含量,单位为微克每升(μg/L);

c₂——从标准曲线上查出的微囊藻毒素含量,单位为微克每升(μg/L);

V₂——水样的稀释倍数。

计算结果应表示到小数点后两位。

4.6 允许差

同一水样,两次平行测定结果之差,不得超过平均值的 10%。

5 测定结果的保证与控制

每一测定批次,应使用已知量的样品做测定结果的控制试验。

参 考 文 献

高效液相色谱法

- [1] Lawton L. A. , Edwards C. , Codd G. A. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst*, 1994, 119(7): 1525-1530.
- [2] Ikawa M. , Phillips N. , Haney J. F. , et al. Interference by plastics additives in the HPLC determination of microcystin-LR and -YR. *Toxicon*, 1999, 37(6): 923-929.
- [3] Ramanan S. , Tang J. , Velayudhan A. Isolation and preparative purification of microcystin variants. *J Chromatogr A*, 2000, 883(1): 103-112.

间接竞争酶联免疫吸附法

- [1] An J. , Carmichael W. W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon*, 1994, 32:1495-1507.
 - [2] Rivasseau C. , Racaud P. , Deguin A. , et al. Evaluation of an ELISA Kit for the Monitoring of Microcystins (Cyanobacterial Toxins) in Water and Algae Environmental Samples. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33(9): 1520-1527.
 - [3] Jarkko R. , Kirsti E. , Jaana K. , et al. Detection of Microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay comparison of methods. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 466: 213-231.
-

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
水 中 微 囊 藻 毒 素 的 测 定
GB/T 20466—2006

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

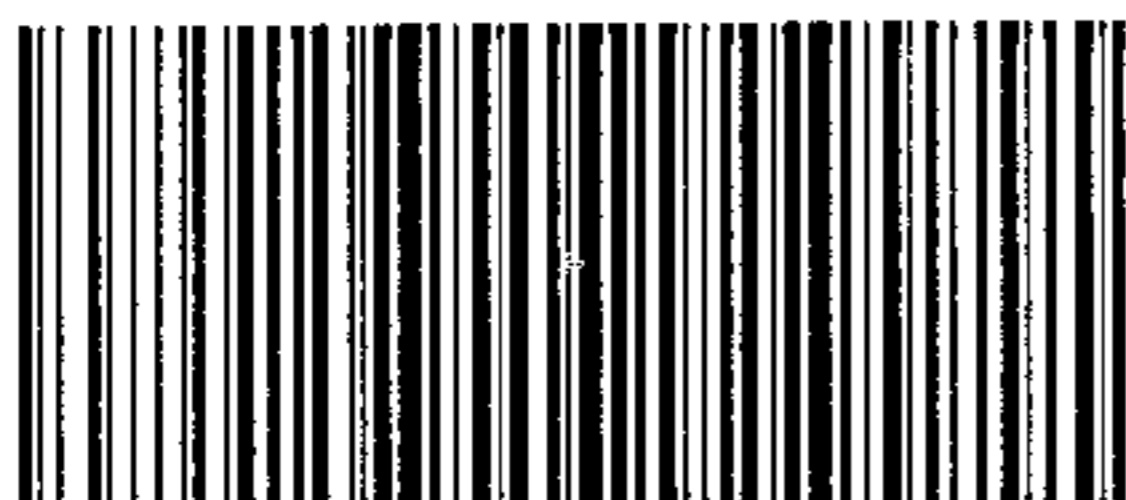
电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

·开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字
2006年12月第一版 2006年12月第一次印刷

*



GB/T 20466-2006

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533